



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 354 661**

⑫ Número de solicitud: 200801324

⑬ Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.05.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**17.03.2011**

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Silva González, Augusto;**  
**García Benzaquen, Leyre y**  
**Valle Torres, Ignacio del**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de membrana de células progenitoras neurales, anticuerpos producidos por dicho método, y usos.**

㉑ Resumen:

Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de membrana de células progenitoras neurales, anticuerpos producidos por dicho método, y usos.

La presente invención se refiere a un método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana de célula progenitoras neurales, a los anticuerpos producidos por dicho método, entre ellos, los anticuerpos aquí denominados NILO1 y NILO2, y depositados en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, con el número de acceso DSM No. ACC2887 y DSM No. ACC2881, respectivamente. Los anticuerpos obtenidos por el método de la invención, entre ellos NILO1 y NILO2, pueden emplearse en para identificar, aislar y enriquecer poblaciones en células progenitoras, incluyendo células progenitoras de sistema nervioso.

ES 2 354 661 A1

## DESCRIPCIÓN

Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de membrana de células progenitoras neurales, anticuerpos producidos por dicho método, y usos.

La presente invención se refiere al empleo de los anticuerpos monoclonales, denominados NILO1 y NILO2, que se unen a marcadores de superficie celular, con el fin de identificar, aislar y enriquecer poblaciones en células progenitoras, incluyendo células progenitoras del sistema nervioso central. También se refiere al método específico para obtener los anticuerpos, a una composición farmacéutica que contenga dichos anticuerpos y a sus usos, entre los que se incluye un método para identificar el efecto de una molécula o fármaco sobre poblaciones de células progenitoras.

## Estado de la técnica anterior

Con pocas excepciones, las poblaciones neuronales del sistema nervioso central (SNC) habían sido consideradas como esencialmente posmitóticas y diferenciadas, sin capacidad de ser reemplazadas tras su muerte. La confirmación de procesos de neurogénesis activa, principalmente en dos áreas del SNC adulto de todos los mamíferos (Altman and Das, 1965. *J Comp Neurol* 124: 319-35; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000. *Prog Brain Res* 127: 1-11; Bedard and Parent, 2004. *Brain Res Dev Brain Res* 151: 159-68; Bonnert *et al.*, 2006. *Eur J Neurosci*; Lenington *et al.*, 2003. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 99), sugiere un potencial del cerebro para regenerarse, incluyendo el cerebro humano. Esto ofrece un futuro prometedor para las terapias de reemplazo celular y, por lo tanto, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, para las cuales todavía no se dispone de un enfoque terapéutico efectivo.

Las células madre neurales constituyen el origen de todas las células cerebrales, las neuronas y la glia. Las células de glia, inicialmente consideradas como células de soporte, incluyen a los astrocitos, células con forma estrellada e involucradas en diferentes funciones, y los oligodendrocitos, que rodean con mielina los axones de las neuronas para protegerlos. El número de células madre neurales es muy escaso en un cerebro adulto, aunque la neurogénesis se mantiene a lo largo de la vida en ratones y probablemente en humanos.

Las células madres neurales se concentran principalmente en unos nichos determinados del tejido nervioso central que son particularmente, la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral (Doetsch *et al.*, 1999. *Cell* 97: 703-16) y la zona subgranular del hipocampo, debajo del giro dentado. La zona subventricular telencefálica (SVZ) es la fuente principal de células madre neuronales en ratones adultos, generando las neuronas del bulbo olfatorio (OB) (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000. *Prog Brain Res* 127: 1-11; Bedard *et al.*, 2002. *Eur J Neurosci* 16: 1917-24; Doetsch *et al.*, 2002. *Neuron* 36: 1021-34; Dutton and Bartlett, 2000. *Dev Neurosci* 22: 96-105; Pencea *et al.*, 2001. *Exp Neurol* 172: 1-16). La SVZ consiste en una lámina delgada de células proliferando activamente en la edad adulta, cubriendo las paredes de los ventrículos laterales. (Doetsch *et al.*, 1999. *Cell* 97: 703-16). Algunas de estas células progenitoras están concentradas en el cuerpo anterior del ventrículo, dando lugar a la vía migratoria rostral (RMS = *rostral migratory stream*).

Eventualmente las células madre neurales pueden también derivar del bulbo olfatorio como resultado de la migración de las células subependimales por la vía migratoria rostral (Álvarez-Buylla y Lim, 2004. *Neuron* 41: 683-6). Estas áreas se definen como neurogénicas dada la posibilidad de obtener *in vitro* células capaces de mantener la autorenovación creciendo o en monoláminas sobre sustrato recubierto de tejido o como agregados de células conocidos como neuroesferas. Las células madre neurales pueden proliferar y mantener la capacidad de autorenovación si crecen en el medio apropiado suplementado con EFG y FGF básico. La retirada de estos factores del medio provoca la diferenciación en los principales tipos neurales, neuronas y células de la glia (astrocitos y oligodendrocitos).

De estas zonas proliferativas, se han aislado las células pluripotentes y se han clonado y expandido en cultivo. Bajo condiciones *in vitro*, o luego de ser transplantadas, estas células tienen la capacidad de generar los tres principales tipos celulares del sistema nervioso central y, por ello, son clasificadas como células pluripotentes neurales.

La sustitución funcional de poblaciones neuronales específicas mediante trasplante de tejido neural representa una estrategia terapéutica atractiva para tratar enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, actualmente, las células madre neurales se obtienen a partir de tejido cerebral, mediante biopsia de tejido o necropsia, lo que plantea problemas éticos y de compatibilidad inmunológica. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar una fuente de células madre neurales que supere los inconvenientes mencionados.

En este sentido, se conocen anticuerpos monoclonales que identifican células madres neurales utilizando antígenos presentes en el interior de la célula (antígenos intracitoplasmáticos), que tienen como inconveniente que no pueden ser utilizados para seleccionar poblaciones celulares viables, ya que requieren permeabilizar la membrana citoplásmica, con la consiguiente muerte celular, para que el anticuerpo pueda unirse a su antígeno que está en el interior de la célula. Existen muchos anticuerpos monoclonales intracitoplasmáticos que caracterizan células precursoras neurales, como nestina, Sox2, Vimentina, o GFAP (para precursores muy inmaduros) y doblecortina, PSA-NCAM, Ki67, y tubulina  $\beta$ -III (para precursores proliferativos, y neuroblastos), pero hasta la fecha solo se han caracterizado unos pocos anticuerpos frente a los antígenos de superficie de las células progenitoras neurales.

Se ha propuesto la pérdida de tejido neural como la causa de algunas patologías neuro-degenerativas que conlleven a una pérdida progresiva de respuesta cerebral y la muerte del individuo. Hoy no existen tratamientos curativos de

estas enfermedades y solo determinados tratamientos paliativos logran mejoras temporales de la enfermedad. Una de las razones de esta situación de cura temporal, es por la imposibilidad de suministrarles a estos enfermos mediante el trasplante nuevas células madre neurales, una terapia celular que les permitiría regenerar, al menos en parte, el tejido dañado y mejorar su situación, probablemente de forma definitiva.

Pero hasta hoy ha sido prácticamente imposible obtener herramientas que permitan la purificación de células madre para su posterior enriquecimiento, selección y estudio o uso como agentes terapéuticos, lo que indica claramente la necesidad de encontrar nuevos marcadores de superficie contra las células neurales.

## 10 Explicación de la invención

Existe, por tanto, la necesidad de encontrar una herramienta que permita la detección de células progenitoras para el enriquecimiento de poblaciones de células madre y precursores tempranos, lo que permitiría su estudio y uso como agentes terapéuticos.

En este sentido y de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana de células progenitoras que comprende:

- a. Generación de neuroesferas que contengan células madre neurales (CMN) a partir del bulbo olfativo de un embrión de ratón de 13,5 días de edad.
- b. Inmunización de un hámster armenio macho de 4 meses de edad con células viables de neuroesferas
- c. Obtención de los linfocitos mediante la extracción del bazo de dicho animal
- d. Fusión de los linfocitos con células de mieloma no-productor de ratón, dando lugar a células híbridas o hibridomas
- e. Determinación y/o selección de los anticuerpos producidos por los hibridomas mediante citometría de flujo de células de neuroesferas, donde las células muertas se excluyen del análisis, en presencia de yoduro de propidio.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona unos anticuerpos monoclonales, obtenidos por el procedimiento anterior, que comprenden:

a) el anticuerpo monoclonal, denominado NILO1 (clon 1 B6.2.13), producido por el hibridoma depositado el 12 de marzo de 2008 con el número de acceso DSM No. ACC2887 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, y cuya secuencia nucleotídica codificante de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 1, y la secuencia nucleotídica codificante de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 2.

b) el anticuerpo monoclonal, denominado NILO2 (clon 2 B7.10), producido por el hibridoma depositado el 4 de febrero de 2008 bajo el número de acceso DSM No. ACC2881 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ), Braunschweig, Alemania, y cuya secuencia nucleotídica codificante de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3, y la secuencia nucleotídica codificante de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 4.

Un tercer aspecto de la presente invención lo constituyen los fragmento/s activo/s de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la reivindicación anterior.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una construcción genética de ARN ó ADN capaz de transcribirse a un anticuerpo/s o fragmento/s de anticuerpo/s de la invención, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Dicha construcción genética, dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia o secuencias del anticuerpo o anticuerpos (NILO1 y/o NILO2) o fragmento o fragmentos del mismo o de los mismos, de la invención, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante de un anticuerpo de la invención o del fragmento de anticuerpo de la invención para su transcripción, b) secuencia de nucleótidos, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para su transcripción y regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc... Múltiples de estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 1989) y forman parte de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención lo constituyen los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales NILO 1 y NILO 2, depositados bajo el número de acceso DSM No. ACC2887 y DSM No. ACC2881 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ), Braunschweig, Alemania.

Otro aspecto de la presente invención describe un método para producir una población altamente enriquecida en células madre ó progenitoras que comprende:

a) Poner en contacto una población de células con un reactivo que reconoce un epítipo o determinante antigénico en un marcador de superficie celular reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 1 y/o el anticuerpo monoclonal NILO2; y

b) Seleccionar las células en las que existe un contacto entre el reactivo y el epítipo o determinante antigénico.

En una realización preferida de la presente invención, las células madre, son células madre del sistema nervioso central humano que puede iniciar neuroesferas (NS-IC).

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la población conteniendo células neurales o células derivadas neurales se obtiene de un cultivo de neuroesferas.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención el reactivo se selecciona de una lista que comprende:

a) un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de reconocer un epítipo o determinante en el marcador celular de superficie reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 1,

b) un anticuerpo, o fragmento del mismo, capaz de reconocer un epítipo o determinante en el marcador celular de superficie reconocido por el anticuerpo monoclonal NILO 2,

c) un anticuerpo NILO 1 o fragmentos activos del mismo.

d) un anticuerpo NILO 2 o fragmentos activos del mismo.

e) un ligando o una molécula que se une al marcador de superficie reconocido por el anticuerpo NILO1,

f) un ligando o una molécula que se une al marcador de superficie reconocido por el anticuerpo NILO2,

g) un fluorocromo conjugado,

h) un conjugado con partículas magnéticas.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención el reactivo contiene el anticuerpo monoclonal NILO1 y/o NILO 2, acoplado o acoplados a marcadores como enzimas, cromóforos, materiales quimioluminiscentes, radionucleótidos o nanopartículas.

En una realización aún más preferida de la presente invención, la selección de las células progenitoras se realiza mediante técnicas de citometría de flujo, citometría de flujo FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), o de microscopía, o utilizando técnicas de inmunocitoquímica (células) o inmunohistoquímica (tejido), o por selección magnética, o por cualquier otro método de selección positiva.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una población enriquecida de células madre o células progenitoras neurales. Dicha población enriquecida se ha obtenido según el método descrito previamente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la población enriquecida en células madre o células progenitoras se usa como medicamento.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la población enriquecida en células madre o células progenitoras se usa en el tratamiento de patologías degenerativas o que cursen con procesos de destrucción tisular. Entre estas enfermedades se encuentran, pero sin limitarse a, el Alzheimer, el Parkinson, la diabetes, la necrosis cardiovascular o la depleción hematopoyética.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe un método de *screening* o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:

a) seleccionar de una población que contiene células neurales o células derivadas neurales que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 1 y/o al anticuerpo monoclonal NILO 2, y de este modo producir una población enriquecida para

células humanas iniciadoras de neuroesferas (NS-IC) si se compara con la población de células neurales o derivadas neurales,

b) inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida,

c) administrar una composición con potencial farmacéutico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y

d) comparar el efecto de dicha administración entre ambos mamíferos.

En una realización preferida de la presente invención, el mamífero no humano es un roedor.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe un método de screening o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:

a) seleccionar de una población que contiene células neurales o células derivadas neurales que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 1, y enriquecer más aún dicha población por selección adicional de las células que se unen al anticuerpo monoclonal NILO 2, y de este modo producir una población enriquecida para células humanas iniciadoras de neuroesferas (NS-IC) si se compara con la población de células neurales o derivadas neurales,

b) inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida para CNS-SC humanas que pueden iniciar neuroesferas (NS-IC)

c) administrar una composición con potencial farmacéutico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y

d) comparar el efecto de dicha administración

En una realización preferida de este aspecto de la invención se describe un método como el anterior, en el que el mamífero no humano es un roedor.

## Definiciones

El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un marcador de superficie o un epítipo. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina.

La expresión “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” tal como se emplea en esta memoria, alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de las células progenitoras. Una composición de anticuerpo monoclonal, por tanto, manifiesta una única afinidad de unión para la célula progenitora con la que inmunorreacciona. Los anticuerpos convencionales, o “anticuerpos policlonales” incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes distintos (epítopos), mientras que cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único epítipo en el antígeno.

El término “epítipo” en esta memoria se refiere a la parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos, células B, o células T. Aunque usualmente se piensa que los epítopos se derivan de proteínas no propias, las secuencias derivadas del hospedador pueden ser reconocidas y también clasificadas como epítopos.

Usando tecnología de ADN recombinante, es posible construir un anticuerpo monoclonal uniendo la región variable o de reconocimiento antigénico a un armazón de un anticuerpo humano. Así, el anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la célula progenitora y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

Un “anticuerpo recombinante” es uno que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del anticuerpo, o produce el mismo como resultado de la recombinación homologa.

“Transformación” y “transfección” se utilizan de manera intercambiable para referirse al procedimiento de introducción del ácido nucleico en una célula. Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora o puede existir como un elemento extracromosomal. La “célula hospedadora” incluye una célula en un cultivo *in vitro* así como una célula en un animal hospedador. En la patente US

5,534,615 se describen, por ejemplo, algunos de estos procedimientos para la producción recombinante de polipéptidos.

Se dice que una célula ha sido “genéticamente alterada”, “transfectada” o “genéticamente transformada” cuando un polinucleótido ha sido transferido a una célula por cualquier método disponible mediante manipulación artificial, o cuando la célula es la progenie de la originalmente alterada que tiene inherentemente el polinucleótido transferido. El polinucleótido puede comprender, a menudo, una secuencia que puede transcribirse y que codifica una proteína de interés, la cual permite a la célula expresar dicha proteína. La alteración genética se dice que es “heredable” si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.

Los anticuerpos también pueden ser “quiméricos”, inmunoglobulinas en las que una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homologa a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de un especie determinada o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s) a, o homóloga(s) a, las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada (patente US 4,816,567).

El término “región hipervariable” cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable”. Los residuos de sostén (en inglés “framework”) o “FR” son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, tal y como se han definido en el presente documento.

En la mayoría de casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de las regiones hipervariables del receptor se han sustituido por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o un primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

En algunos casos, los residuos de sostén (FR) de la región Fv de inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más la función del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o prácticamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, por lo menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), en general de una inmunoglobulina humana. Distintos procedimientos para la obtención de anticuerpos humanizados son conocidos en el estado de la técnica.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable, del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; homodímeros bivalentes (en inglés “diabodies”); anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multispecíficos formados por fragmentos de anticuerpos. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos proceden de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora de manera directa mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos de anticuerpos. De manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. En otra realización, el F(ab')<sub>2</sub> se forma utilizando la cremallera de leucinas GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')<sub>2</sub>. De acuerdo con otra aproximación, se pueden aislar directamente los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los practicantes expertos. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Para una revisión, véase WO/1993/016185.

El “Fv de cadena sencilla” (scFv) o los “fragmentos de anticuerpos” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. En general, el polipéptido Fv comprende, además, un engarce polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que forme la estructura deseada para la unión a antígeno.

El término “homodímeros bivalentes” se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo estos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica. Utilizando un engarce que sea demasiado corto para dejar que se emparejen los dos dominios en la misma cadena, se fuerzan los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere a anticuerpos que comprenden un par de segmentos tándem Fd (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los “anticuerpos multiespecíficos” tienen especificidades de unión para, por lo menos, dos epítomos diferentes, en donde los epítomos son, normalmente, de antígenos diferentes. Mientras que tales moléculas normalmente se unirán solo a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales tales como los anticuerpos trispecíficos, se engloban dentro de la expresión cuando es utilizada en el presente documento.

5 En el estado de la técnica se conocen procedimientos para la preparación de anticuerpos biespecíficos. En la presente invención los fragmentos de anticuerpo son capaces de unirse específicamente a un epítomo de una célula progenitora.

El término “célula madre” se refiere a una célula indiferenciada relativamente quiescente que es capaz de proliferar y dar lugar a más células madre, teniendo asimismo la habilidad de generar un gran número de células progenitoras que, a su vez, pueden dar lugar a células diferenciadas, o células hija diferenciadas o diferenciables. Pueden automantenerse, lo que significa que con cada división celular, una célula hija será también una célula madre.

El término “célula madre neural” (CMN) se refiere a las células madre multipotenciales capaces de producir una progenie que sea capaz de diferenciar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

15 El término “célula progenitora” se refiere a una célula no diferenciada derivada de una célula madre. La célula progenitora puede autorenovarse pero tiene una capacidad proliferativa limitada (a diferencia de una célula madre, la capacidad de proliferación está limitada y, por lo tanto, no exhibe un automantenimiento). Está comprometida a una vía particular de diferenciación y eventualmente, en condiciones apropiadas, a diferenciar a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos.

El término “células precursoras” se refiere a las células vivas modificadas o manipuladas mediante los métodos del invento inmediato que se derivan de células madre, *in vivo* o *in vitro*, e incluyen tanto células progenitoras como células madre, siendo por tanto autorrenovables y multipotentes. *In vitro*, las células precursoras derivadas de las células madre neurales crecen típicamente en la forma de neuroesferas, pero pueden exhibir diferentes patrones de crecimiento dependiendo de las condiciones de cultivo.

El término “neuroesfera” se refiere a un agolpamiento de células derivadas de células madre neurales y cultivadas *in vitro*. Al menos algunas de las células son del fenotipo nestina (+) (que reaccionan con la nestina, marcador intracitoplasmático de células madre neurales). El agrupamiento está compuesto de células madre y/o células progenitoras, y puede o no incluir células diferenciadas.

La fuente preferente de tejido neuronal se obtiene a partir de mamíferos, preferentemente de roedores (por ejemplo, ratones y ratas) y de primates, siendo el más preferente a partir de humanos (excluyendo tejidos embrionarios humanos). En las patentes US 5,750,376 y 5,851,832 se describe un método para el aislamiento y proliferación de células madre neuronales del SNC autorenovables y multipotenciales a partir de tejido neuronal de humano adulto, de mono Rhesus adulto, de embrión de ratón, y a partir de tejido cerebral de ratón juvenil y adulto. El método incluye el establecimiento de células madre neuronales en el cultivo a partir de células madre neuronales del SNC, así como la diferenciación de la progenie de la célula madre neuronal del SNC.

El término “ventrículo” se refiere a cualquier cavidad o conducto dentro del sistema nervioso central a través del que fluye el fluido cerebroespinal. Así, el término no sólo abarca los ventrículos laterales, tercero y cuarto, sino también abarca el canal central y el acueducto cerebral.

El término “tejido ventricular” se refiere a los tejidos que revisten los ventrículos del SNC e incluyen el subependima que comprende una colección de células no diferenciadas incluyendo las células madre del SNC y las células progenitoras.

El término “población proliferante de modo constitutivo” se refiere a la población de células que se dividen localizadas dentro del subependima de los ventrículos laterales del cerebro anterior de mamíferos adultos [como se perfiló por Smart; J. Comp. Neurol. 116:325, (1961)], y comprende aproximadamente el 33% de las células en algunas regiones del subependima [Morshead y van der Kooy, J. Neurosci. 12:249, (1992)].

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 60 Descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama describiendo el origen de los hibridomas NILO.

A partir del bulbo olfativo de un embrión de 13,5 días se generan neuroesferas que en pase 5-6 son usadas como antígenos para inmunizar un hámster armenio (*Cricetulus migratorius*) adulto con tres inyecciones de 5 millones de células, durante tres meses. Tres días después de la última inmunización las células del bazo se fusionan con el mieloma no productor de Balb/c P3-X63.Ag8.653. Los clones seleccionados en HAT, se crecen y se analizan mediante citometría de flujo.

Figura 2. *Diagrama del método de selección de los anticuerpos monoclonales.*

a) Se seleccionan por citometría de flujo los anticuerpos monoclonales que marquen con cierta intensidad células derivadas de neuroesferas del bulbo olfativo de ratones de 13,5 días y neuroesferas derivadas de la SVZ de ratones adultos 6 semanas. La citometría se realizó en un Coulter XL; se pasaron 10,000 eventos seleccionándose aquellos con morfología celular y que no eran teñidos con yoduro de propidio, para excluir a las células muertas, b) Mareaje de células de tejido neural derivado de la SVZ de ratones de seis semanas, para NILO1 o NILO2, y tras sus diferentes pasos en cultivo celular como neuroesferas.

Figura 3. *Mareaje de células de neuroesferas con NILO1 y NILO2 mediante inmunocitoquímica.*

a) Las neuroesferas fueron marcadas simultáneamente con nestina y con un anticuerpo secundario policlonal anti-ratón-FITC y con NILO1 utilizando un secundario anti-hámster marcado con Cy5. b) igual que a) pero marcando con anti-GFAP, NILO1 y DAPI (núcleos), c) d) y e) neuroesferas en Matrigel® marcados con NILO2.

Figura 4. *Doble expresión de NILO y anticuerpos que definen poblaciones neurales en células de neuroesferas sobre Matrigel®.*

a) y c) NILO1 con GFAP a diferentes aumentos; b) y d) NILO2 con GFAP a diferentes aumentos; e) NILO1 y nestina; f) NILO1 y Ki67.

Figura 5. *Mareaje de cortes de cerebro con NILO1 detectando células progenitoras neurales en regiones neurogénicas del SVZ.*

Cortes de criostato de tejido fijado con paraformaldehído y teñido con NILO1 (verde-FITC) y doblecortina (DCX), GFAP, Vimentina, Tubulina  $\beta$ III (Tuj1), Ki-67 y PSA-NCAM. Los anticuerpos monoclonales están indicados en la Tabla 1.

Figura 6. *Mareaje de cortes de cerebro con NILO2 detectando células progenitoras neurales en regiones neurogénicas del SVZ.*

Cortes de criostato de tejido fijado con paraformaldehído y teñido con NILO2 (verde-FITC) y doblecortina (DCX), GFAP, Vimentina, Tubulina  $\beta$ III (Tuj1), Ki-67 y PSA-NCAM. Los anticuerpos monoclonales están indicados en la Tabla 1.

Figura 7. *Proteína de superficie inmunoprecipitada por NILO2 en células derivadas de neuroesferas y en la línea células C2C12.*

Las células son incubadas con NILO2 y posteriormente lisadas con tampón de lisis en presencia 5% de Brig58 (Sigma). Los extractos purificados se revelan con diferentes métodos.

Figura 8. *Efecto de NILO1 y NILO2 sobre la proliferación de las células de neuroesferas.*

Las células se incuban en presencia de las concentraciones de anticuerpo indicado durante 24, 48 y 72 horas y la proliferación medida utilizando el compuesto MTS tetrazolium para medir la proliferación.

Figura 9. *Efecto de NILO1 y NILO2 sobre la diferenciación de las células de neuroesferas.*

Las células se incuban en presencia de medio de neuroesferas en ausencia de FGF2 y EGF y en presencia de 0,5% de FCS, lo que provoca una rápida diferenciación de las células precursoras hacia las células diferenciadas. En presencia de las concentraciones de anticuerpo indicado durante 2 días y 4 días medimos la capacidad de las células de proliferar, utilizando el MTS tetrazolium para medir la proliferación y su capacidad de diferenciarse o mantener su estructura de neuroesfera.

Figura 10. *NILO1 es capaz de identificar células precursoras mesenquimales presentes en médula ósea.*

a) Las células de médula ósea se seleccionan mediante citometría de flujo (sorting) utilizando NILO1, o b) se seleccionan por su capacidad de adherencia y de obtener células mesenquimales. c) células precursoras mesenquimales en médula ósea o seleccionadas tras una semana en cultivo marcadas con NILO1. d) células de médula ósea o mesenquimales marcadas con Sca-1, Alpha6, betal, NILO1 y NILO2, e) células NILO1 tras dos semanas en medio de



neuroesferas y f) su diferenciación en células Tuj1+, o g) células NILO1 tras seis semanas en medio de diferenciación de adipocitos (teñidos con red oil) o h) sin teñir (gotas de grasa).

Figura 11. *NILO1 es capaz de identificar células precursoras mesenquimales presentes en tejido mamario*, a) Células formadoras de mamoesferas. b) Células identificadas con NILO1 y NILO2, marcadas con Sca-1. c) Comparación entre la capacidad de reconstruir una mama tridimensional de las células NILO1- y NILO1+, tras el trasplante del tejido precursor mamario en la grasa mamaria de ratones de laboratorio, analizadas a las 8 semanas post trasplante.

## Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO2.

### Ejemplo 1

#### *Generación de los anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO 2*

Presentamos un método de obtención de anticuerpos monoclonales frente a células madre neurales, que cuenta con el uso de neuroesferas derivadas de células embrionarias de 13,5 días, como fuente de estímulo antigénico y la utilización de hámster armenios de menos de tres meses de edad, como receptor de las inmunizaciones, a través de una pauta específica. La obtención del bazo y su fusión con células de mieloma de ratón, permite, tras la selección en medios selectivos específicos de hibridomas inter-especie que secretan anticuerpos monoclonales de origen hámster y con especificidad contra células madre neurales, tanto de origen embrionario como de células madre neurales de animales adultos.

#### *Antígeno utilizado para la inmunización*

Se emplearon células madre neurales (CMN) derivadas de neuroesferas. Las células que crecen como neuroesferas pueden disgregarse y clonarse en cultivos siendo capaces de formar nuevas neuroesferas. Las células que forman parte de las neuroesferas se consideran células progenitoras neurales al ser capaces de diferenciarse en cultivos “*in vitro*” en los diferentes tipos celulares del cerebro como son neuronas y glía (astrocitos y oligodendrocitos). Además, estas células tienen marcadores intracelulares definidos, como “nestina”, y pueden ser diferenciadas hacia células de cualquiera de los linajes neurales como neuronas, oligodendrocitos o astrocitos.

Estas CMN pueden mantenerse en cultivo a través de pases de diluciones celulares, aunque las condiciones y peculiaridades de las células en proliferación pueden cambiar en función del número de pases que se mantengan en cultivo. Este protocolo, para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a estas CMN utiliza células en pase de 3 a 5, siendo el pase 0, el momento de obtener estas células del tejido del ratón.

Existen diferentes regiones cerebrales en el ratón adulto que pueden ser utilizadas para obtener CMN. Las zonas neurogénicas más importantes son la región subventricular (SVZ) y la región granulosa del giro dentado de la hipófisis. Sin embargo, la eficiencia de obtención de células CMN en el ratón adulto es baja, y dado que se requieren un mínimo número de células para llevar a cabo las repetidas inmunizaciones, nuestro protocolo obtiene las CMN de tejido embrionario de ratones de 13,5 días, concretamente del bulbo olfatorio. De este tejido es fácil obtener cantidades importantes de CMN, que pueden ser utilizadas para inmunizar.

#### *Animales utilizados para la inmunización*

Para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a células progenitoras neurales de ratón, se han utilizado hámster armenios, machos, de 4 meses de edad. Los animales son mantenidos en el animalario en condiciones normales de temperatura y humedad, al igual que otros ratones, aunque en una sala independiente y en condiciones de tranquilidad. Aunque los hámsteres armenios habían sido ya usados para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a otros antígenos de ratón, nunca hasta la fecha han sido utilizados para generar anticuerpos frente a componentes neurales. Es importante que se usen hámster armenios, no sirviendo de igual manera otras subespecies de hámster.

Los animales fueron inmunizados con células viables de neuroesferas disgregadas, inyectadas en PBS a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml. La vía de inmunización fue siempre intra-peritoneal, utilizando una aguja hipodérmica y en localizaciones alternas en cada inmunización (“booster”). La pauta de inmunización fue la siguiente: día 0, 30 días y 60 días. Tras la tercera re-inmunización con las células derivadas de neuroesferas, se esperan tres días y se sacrifica el animal, tras anestesia total, para extraer el bazo, que será utilizado para la extracción de los linfocitos y su posterior fusión con las células del mieloma.

*Fusión celular*

El protocolo de fusión es similar al previamente descrito por otros autores. Brevemente, los linfocitos derivados del bazo del hámster inmunizado con CMN, se lavan en medio y se resuspenden en medio DMEM sin suero. Las células del mieloma de ratón y las células que se van a fusionar se mezclan en un tubo de 50 ml Falcon. Usamos  $10^7$  células de mieloma no-productor del ratón Balb.c denominado P3-X63.Ag8.653 y  $10^6$  células del bazo del hámster inmunizado por fusión. Las células se centrifugan juntas a 1500 r.p.m., durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante por aspiración para eliminarlo todo. El tubo solo con las células se pone en un baño a 37°C. Se añade 0.4 ml de polietilenglicol (PEG al 40% en agua) gota a gota sobre la suspensión celular, durante 1 minuto con agitación suave ocasional. Posteriormente se diluye lentamente gota a gota con 5 ml de medio DMEM sin suero y previamente atemperado a 37°C, por un periodo no superior a 3 minutos. La suspensión se mezcla con suavidad, se completa con medio completo DMEM-10% FCS y se incuba a 37°C de 30 a 45 min. Luego las células se distribuyen en 0,1 ml/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se guardan en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Un día después de la fusión se añaden 0.1 ml/pocillo de medio DMEM-10% FCS conteniendo HA(2X). El medio se aspira y se cambia una vez a la semana. Los híbridos se detectan visualmente o bajo microscopio invertido a baja resolución. Tres semanas después de la fusión las colonias se traspasan a pocillos de placas de 24 pocillos con 2 ml de medio selectivo por pocillo.

*Selección de anticuerpos con especificidad para las células madre neurales*

La selección se realiza mediante detección de células marcadas positivamente con nuestros anticuerpos en citometría de flujo frente a células CMN, derivadas; 1) neuroesferas de bulbo olfativo de embriones de 13,5 días, 2) neuroesferas de ratones adultos; 3) células del tumor de timo de ratón BW5147, 3) células de la médula ósea de ratones adultos.

El mareaje se realiza utilizando una dilución 1/2 del sobrenadante del cultivo celular. El anticuerpo secundario utilizado es un anti-hámster IgG (cocktail) (Becton Dickinson, Ltd.) marcado con distintas alternativas (fluorocromos FITC, PE o biotina).

Los sobrenadantes de la fusión que marcaban las células CMN de las neuroesferas y que eran negativas para el timoma BW5147, se expanden y se congelan. Se seleccionaron aproximadamente 80 anticuerpos de los 295 híbridos seleccionados. Entre los sobrenadantes seleccionados están los anticuerpos monoclonales denominados NILO1 y NILO2.

*Ejemplo 2**Identificación de células de neuroesferas con los anticuerpos monoclonales NILO*

NILO1 y NILO2 son inmunoglobulinas IgG de hámster que son producidas por hibridomas entre linfocitos B de hámster y el mieloma no productor P3-P3-X63.Ag8.653.653 derivado del ratón Balb/c. A pesar de ser una fusión inter-especies (hámster x ratón) la estabilidad del hibridoma es suficientemente alta para garantizar su selección y clonaje. Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas NILO1 y NILO2, pueden ser purificados mediante columnas de sefarsa unida a proteína G- o a proteína A, lo que garantiza su pureza y permite su mareaje directo con distintos colorantes (fluoresceína, ficoeritrina, etc). Actualmente se dispone de anticuerpos NILO marcados directamente con FITC y con PE.

Los anticuerpos NILO1 y NILO2, tienen una enorme selectividad por células madre neurales, como lo demuestran los estudios de inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, y funcionales presentados en esta memoria.

Por otro lado, se ha ensayado la unión de estos anticuerpos a partículas magnéticas, permitiendo una rápida purificación y en un solo paso de poblaciones progenitoras neurales de otras fuentes. Esto nos ha permitido enriquecer en un solo paso poblaciones de médula ósea que han sido utilizadas en experimentos de reconstitución celular. Esta situación tendrá una enorme repercusión para tratamientos de terapia celular en tratamientos específicos de patologías degenerativas (Alzheimer, Parkinson, etc.) o que cursen con procesos de destrucción tisular y hoy en día con una enorme repercusión (diabetes, necrosis cardiovascular, depleción hematopoyética, etc.).

Para demostrar la gran selectividad de los anticuerpos NILO se han realizado distintos tipos de diseños experimentales. El primer estudio consistió en demostrar el mareaje de las células de neuroesferas, detectadas mediante citometría de flujo. El mareaje de las células con estos anticuerpos se realizó en presencia de yoduro de propidio (10  $\mu$ g/ml) para seleccionar exclusivamente las células negativas para este marcador de ADN, lo que garantizaba el mareaje de células vivas y que el mareaje no era intracitoplasmico (Figura 2). El perfil y el porcentaje de células marcadas por los anticuerpos monoclonales NILO1 y NILO2, difería entre ellos, lo que sugiere que cada anticuerpo esta identificando diferentes proteínas de superficie.

Usando técnicas de inmunocitoquímica se han analizado neuroesferas generadas de la región subventricular de cerebros de ratones adultos (Figura 3a), del bulbo olfativo de cerebros de embriones de ratones de 13,5 (Fig 3b), y del bulbo olfativo de ratones adultos (Figura 3c). Las neuroesferas están marcadas con doble tinción utilizando anticuerpo

anti-nestina o anticuerpo anti-GFAP comerciales. El doble mareaje demuestra la especificidad de las células teñidas y su asociación con el linaje de célula madre neural. Además se realizó mareaje individual sobre células de neuroesferas separadas y adheridas al plástico de las placas de cultivo con Matrigel®, lo que permite su análisis mas detallado individual. En la Figura 4 se puede observar la expresión simultánea de GFAP, nestina y Ki-67 NILO1 o NILO2 sobre células en matrigel. GFAP marca células muy precursoras o células de glia. Claramente se puede observar que aunque la tinción es unicelular en ambos casos con GFAP, el mareaje de GFAP y NILO están localizados en áreas diferentes y no coincidentes dentro de la célula.

En la Figura 3 se puede comprobar la presencia de células NILO1 con la presencia de nestina, marcador intracitoplasmico de células madre neurales, aunque, NILO1 marca una subpoblación celular dentro de las células progenitoras neurales nestina+.

### Ejemplo 3

#### *Marcadores NILO en la región SVZ del cerebro*

Los anticuerpos NILO son específicos de células madre neurales, tal como lo demuestra su presencia exclusiva en regiones neurogénicas de cerebros de ratones adultos. Principalmente se han detectado células positivas para NILO en la región SVZ de ratones adultos y en el giro dentado del hipocampo.

Para demostrar que las células NILO1 y NILO2 se corresponden con células progenitoras neurales realizamos estudio de inmunohistoquímica haciendo dobles mareajes con doblecortina (DCX), nestina (Nes), GFAP, vimentina, tubulina  $\beta$ III, PSA-NCAM y Ki67, todos ellos marcadores asociados a diferentes momentos del desarrollo de las células neurales a partir de las células precursoras neurales y tal como figura en la Tabla 1 adjunta. Los cortes de histoquímica están realizados mediante criostato en cortes semi-gruesos (30 micras), con el fin de analizar las secciones en detalle.

Los datos demuestran que NILO1 (Figura 5) y NILO2 (Figura 6) son marcadores selectivos de poblaciones progenitoras neurales identificando células progenitoras en ciclo y neuroblastos primitivos, ya que su mareaje coincide en células doblemente positivas para DCX, Ki67, Vimentina, Tubulina  $\beta$ III, y en proximidad con el marcador GFAP, que aunque no es directamente coincidente, tal como observamos en histoquímica de las células en matrigel, co-localizan en áreas muy próximas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

*Marcadores utilizados para detectar la presencia de NILO en células y regiones neurogénicas*

<b>Marcador</b>	<b>Referencia comercial</b>	<b>Características del marcador</b>	<b>Publicaciones</b>
<b>Nestina</b>	MAB353 Chemicon	Filamento intermedio presente en progenitores neurales quiescentes y proliferativos y en células de neuroesferas. Negativo en neuroblastos	Niu S et al. Neuron 2005. 41
<b>Glial fibrillary acid protein (GFAP)</b>		Presente en glia radial y en precursores muy tempranos	Viale et al. Arch. A Pathol. Anat. 1991. 418
<b>Vimentina</b>	Ab7783 AbCam	Presente en progenitores tempranos quiescentes	Husse B y Isenberg G. BBRC 2005. 334
<b>Polysialic acid- Neural Cell Adhesión (PSA-NCAM)</b>	Chemicon MAB5324	Presente en neuroblastos 1 y 2 y en neuronas inmaduras. Negativo en precursores quiescentes tempranos y en neuronas maduras	Theodosis D et al. 1999. J. Neuroscience. 19 Rougon G et al. 1982. EMBO J. 1
<b>Doblecortina (DCX) (C-18)</b>	Sc-8066 SantaCruz	Neuroblastos tipo 1 y 2 y en neuronas proliferando	Reiner et al. Nature 1993. 364
<b>Tubulina <math>\beta</math>III (Tuj-1)</b>	Ab14545 AbCam	Propio de neuroblastos 1 y 2, en neuronas inmaduras y maduras	Burgoyne RD, et al. EMBO J. 1988.
<b>Ki67</b>	(Sp6) RM-9106-S1 NeoMarkers	Marcador de proliferación, presente en precursores tempranos proliferativos y en células de neuroesferas	Namiki J y Tator J. Neuropathol Exp Neurol. 1999.

#### Ejemplo 4

#### *Identificación de las proteínas de superficie reconocidas por los anticuerpos NILO*

Para identificar el antígeno reconocido por los anticuerpos NILO se han llevado a cabo inmunoprecipitaciones de estos anticuerpos sobre células progenitoras neurales para conocer el tamaño aproximado de los antígenos reconocidos por ellos. Se han utilizando células progenitoras neurales marcadas en su superficie con biotina o alternativamente la línea C2C12 que es reconocida por los anticuerpos NILO2 y NILO2. Tras el mareaje de las células con biotina, se une el anticuerpo y posteriormente se lisa tal como se describe en Material y Métodos utilizando el detergente Brij1. Las proteínas inmunoprecipitadas con NILO2 tanto en células de neuroesferas como en la línea C2C12 presentan dos bandas mayoritarias de 140 y 170 kD, mientras que NILO1 no puede ser utilizado en "western blot". Estos datos demuestran que cada anticuerpo monoclonal identifica a un diferente tipo de proteína de la superficie celular de las células progenitoras, independiente de la localización similar de estos anticuerpos por inmunohistoquímica. Una situación muy relevante es la que identifica el antígeno de superficie (receptor celular) que es identificado por NILO.

## Ejemplo 5

*Efecto funcional de los anticuerpos NILO1 y NILO2 sobre la proliferación y diferenciación de las neuroesferas*

La distribución celular de NILO es homogénea en las células madre neurales. Las células madre neurales se mantienen en su condición de progenitoras siempre que sean mantenidas bajo estrictas condiciones de cultivo celular en presencia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el factor de crecimiento de epidérmico (EGF) y en ausencia de suero fetal bovino (FCS). En ausencia de estos factores, FGF y EGF y en presencia de FCS, las células detienen su proliferación y se diferencian en cualquiera de las células del linaje neural: neuronas, oligodendrocitos o astrocitos.

Se ha investigado el posible efecto funcional de los anticuerpos NILO sobre la proliferación de las células progenitoras neurales. Utilizando los anticuerpos NILO1 y NILO2 se ha demostrado que la interacción de los anticuerpos con las células madre neurales derivadas de neuroesferas de SVZ de adultos o de OB de E13,5, es capaz de bloquear los procesos de proliferación (Figura 8) y diferenciación (Figura 9) de estas células hacia cualquiera de los tres tipos de células neurales (neuronas, oligodendrocitos o astrocitos).

Tanto NILO1 como NILO2 cuando se añaden en distintas concentraciones a neuroesferas en medios de cultivo que permiten su proliferación, detienen dicha proliferación celular. En presencia continua de los anticuerpos las células mueren a los 5-6 días. Todos estos datos sugieren que los anticuerpos NILO están reconociendo receptores involucrados en los procesos de auto-renovación celular o bien que esta bloqueando a los factores que mantienen la capacidad de autorenovación (tales como LIF u otros) (Figura 8).

Cuando las células de las neuroesferas se ponen en medio de diferenciación en ausencia de los factores FGF2 y EGF, con o sin 0,1% de suero fetal, y en presencia de distintas concentraciones de NILO1 purificado, hemos visto que el proceso de diferenciación se reduce considerablemente en comparación con el efecto observado en ausencia de anticuerpo. NILO2 provoca un efecto similar sobre la diferenciación de las neuroesferas aunque menos acusado que NILO1.

Esto datos demuestran que la interacción continua de NILO con estructuras de superficie de las células progenitoras neurales, genera cambios importantes en el comportamiento de estas células, lo que sugiere que los anticuerpos NILO están reconociendo estructuras de superficie esenciales en la biología de estas células progenitoras.

## Ejemplo 6

*Identificación de células precursoras no neurales identificadas por NILO1*

El análisis de otros tejidos con los anticuerpos monoclonales NILO, demostró que existen otras poblaciones minoritarias fuera del territorio neural que son también marcadas con estos anticuerpos. En concreto, dos poblaciones de células precursoras que son identificadas con el anticuerpo NILO1 son las células precursoras mesenquimales de la médula ósea y las células precursoras de tejido mamario.

Se identificó un pequeño porcentaje de células marcadas con NILO1 en médula ósea y su posible implicación en su conversión con tejido neural en transplantes en cerebros de ratones neonatos. Se investigó y se analizó que tipo de células eran marcadas por NILO1 en médula ósea. Se prepararon células mesenquimales, mediante adherencia al plástico en medio de cultivo con suero fetal, resultando que las células adherentes y que tapizaban el cultivo a los pocos días de su siembra, eran positivas para NILO1 (Figura 10). Estas células, son consideradas mesenquimales ya que en condiciones de cultivo de tejido neural (medio de cultivo para crecer neuroesferas) estas células adquirirían marcadores de nestina y NILO1, así como Sca-1, y de las integrinas  $\alpha 6$  y  $\beta 1$ . Además, estos marcadores se perdían cuando se diferenciaban en medio sin factores FGF2 y EGF, hacia células Tubulina  $\beta$ III+, lo que sugería su posible origen mesenquimal. Además en condiciones de cultivo para diferenciación de células mesenquimales en adipocitos estas células eran capaces en cultivos de 6 semanas de generar células con grasa (Figura 10h) y marcadas con Red Oil (Figura 10g), lo que demuestra su capacidad para generar diversos tipos de tejidos derivados del mesenquimal.

## Ejemplo 7

*Identificación de células precursoras de tejido mamario con NILO1*

En condiciones de disgregación del tejido mamario de ratones de seis semanas, se ha observado que NILO1 es capaz de identificar un pequeño porcentaje de células (<3%). Estas células, capaces de formar mamoesferas, eran débilmente marcadas con Sca-1, lo que sugería que podrían tratarse de células precursoras (Figura 11b). Para demostrar este punto, células disgregadas de tejido mamario se marcaron con el anticuerpo NILO1 y se separaron en esterilidad, las células NILO1+ y las NILO1-, fueron luego usadas en transplantes de tejido precursor mamario en la grasa mamaria de ratones de laboratorio y la presencia de estructuras tridimensionales mamarias analizadas a las 8 semanas, post trasplante (Figura 11c). Como se observa, 1200 células de una selección mediante citometría de células NILO1, eran capaces de reconstituir una mama tridimensional. Estos datos, apuntan a que NILO1 puede reconocer estructuras en células progenitoras de tejido mamario.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana de células progenitoras neurales que comprende:
- a. generación de neuroesferas que contengan células madre neurales a partir del bulbo olfativo de un embrión de ratón de 13,5 días de edad.
  - 10 b. Inmunización de un hámster armenio macho de 4 meses de edad con células viables de neuroesferas
  - c. Obtención de los linfocitos mediante la extracción del bazo de dicho animal
  - 15 d. Fusión de los linfocitos con células de mieloma no-productor de ratón pertenecen al ratón Balb.c dando lugar a células híbridas o hibridomas
  - e. Determinación y/o selección de los anticuerpos producidos por los hibridomas mediante citometría de flujo de células de neuroesferas en presencia de yoduro de propidio.
- 20 2. Anticuerpos monoclonales obtenibles por el método de la reivindicación 1, y **caracterizados** por:
- a. Ser producido por el hibridoma depositado bajo el número de acceso DSM No. ACC2887 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, y cuya secuencia nucleotídica codificante de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 1, y la secuencia nucleotídica codificante de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 2, ó
  - 25 b. Ser producido por el hibridoma depositado bajo el número de acceso DSM No. ACC2881 en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania, y cuya secuencia nucleotídica codificante de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 3, y la secuencia nucleotídica codificante de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 4.
- 30
- 35 3. Fragmento/s inmunológicamente activos de cualquiera de los anticuerpos monoclonales según la reivindicación 2.
- 40 4. Construcción genética de ADN capaz de transcribirse a un anticuerpo/s o fragmento/s de anticuerpo/s de la invención, según cualquiera de las reivindicaciones 2-3.
5. Hibridomas productores de cualquiera de los anticuerpos monoclonales según la reivindicación 2, depositados bajo el número de acceso DSM No. ACC2887 y DSM No. ACC2881, en la autoridad internacional de depósito Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania.
- 45 6. Método para producir una población enriquecida en células progenitoras, que comprende:
- a. Poner en contacto una población de células con un anticuerpo según la reivindicación 2, o un fragmento del mismo; y
  - 50 b. seleccionar las células en las que existe un contacto entre el anticuerpo y dichas células.
7. Método según la reivindicación anterior, donde la población enriquecida en células progenitoras contiene células progenitoras neurales o células derivadas neurales.
- 55 8. Método según la reivindicación anterior, donde la población conteniendo células progenitoras neurales o células derivadas neurales se obtiene de un cultivo de neuroesferas.
- 60 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el anticuerpo según la reivindicación 2, o un fragmento del mismo se encuentra acoplado a marcadores como enzimas, cromóforos, materiales quimioluminiscentes, radionucleótidos o nanopartículas.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde el anticuerpo según la reivindicación 2 se selecciona de una lista que comprende:
- 65 a. El anticuerpo según la reivindicación 2(a), o un fragmento del mismo.
  - b. El anticuerpo según la reivindicación 2(b), o un fragmento del mismo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-10 donde la selección de las células progenitoras se realiza mediante técnicas de citometría de flujo (incluyendo citometría de flujo FACS) o de microscopía, o utilizando técnicas de inmunocitoquímica (células) o inmunohistoquímica (tejido), o por selección magnética o por cualquier otro método de selección positiva.

12. Población enriquecida de células madre o células progenitoras obtenible según el método de cualquiera de las reivindicaciones 6-11.

13. Uso de una población según la reivindicación anterior para la elaboración de un medicamento.

14. Uso de una población según la reivindicación 12 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías degenerativas o que cursen con procesos de destrucción tisular.

15. Método de *screening* o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:

- a. seleccionar de una población que contiene células madre o células progenitoras las que se unen a un anticuerpo según la reivindicación 2, o a un fragmento del mismo, y de este modo producir una población enriquecida para células madre,
- b. inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida,
- c. administrar una composición con potencial farmacéutico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y
- d. comparar el efecto de dicha administración entre ambos mamíferos.

16. Método de *screening* o descubrimiento de fármacos que comprende los siguientes pasos:

- a. seleccionar de una población que contiene células madre o células progenitoras las que se unen al anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2(a), o un fragmento del mismo, y enriquecer más aún dicha población por selección adicional de las células que se unen al anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2(b), o a un fragmento del mismo, y de este modo producir una población enriquecida para células madre si se compara con la población de células original,
- b. inocular en un mamífero no humano dicha población enriquecida para células madre o células progenitoras,
- c. administrar una composición con potencial farmacéutico a dicho mamífero así como a otro mamífero no humano al que no se le ha inoculado la población descrita en la fase anterior (sujeto control); y
- d. comparar el efecto de dicha administración entre ambos mamíferos.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15-16 donde el mamífero no humano es un roedor.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15-17 donde las células madre o células progenitoras son células madre neurales o células progenitoras neurales.

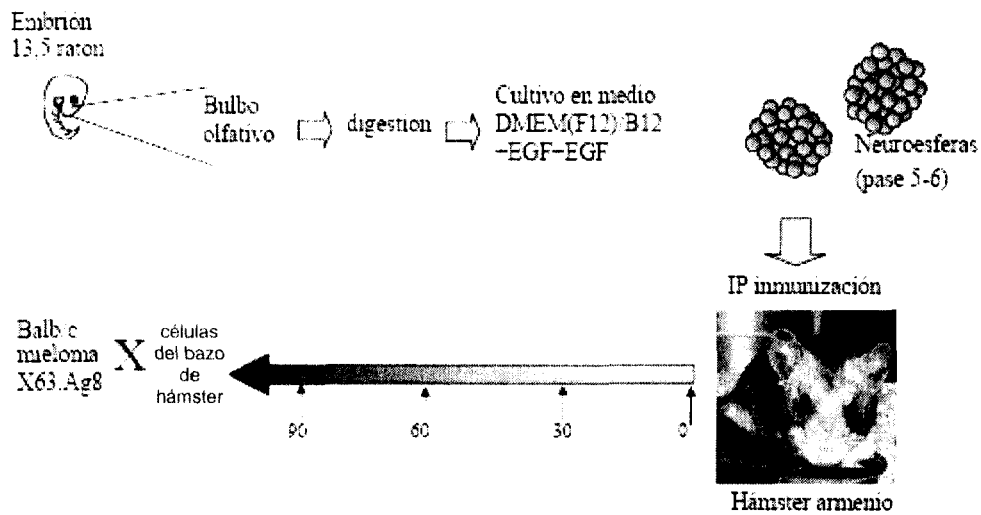


FIG.1

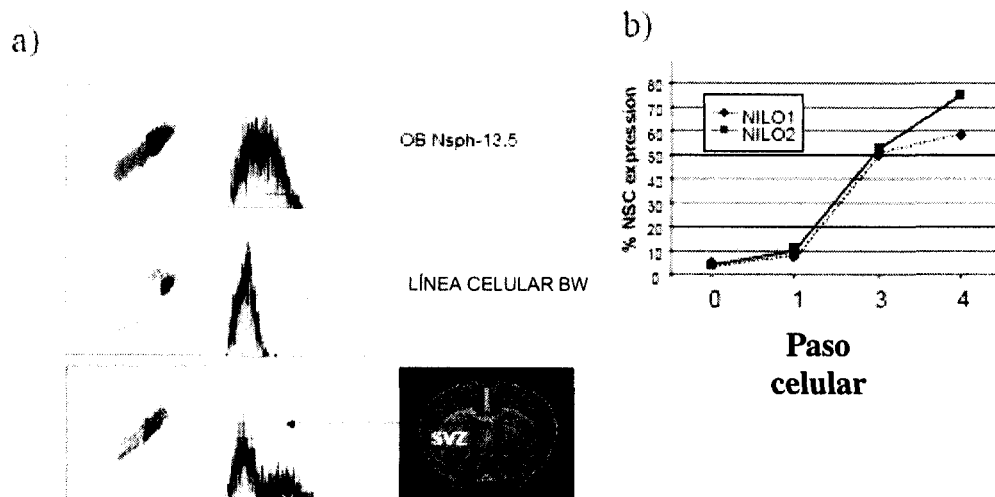


FIG. 2



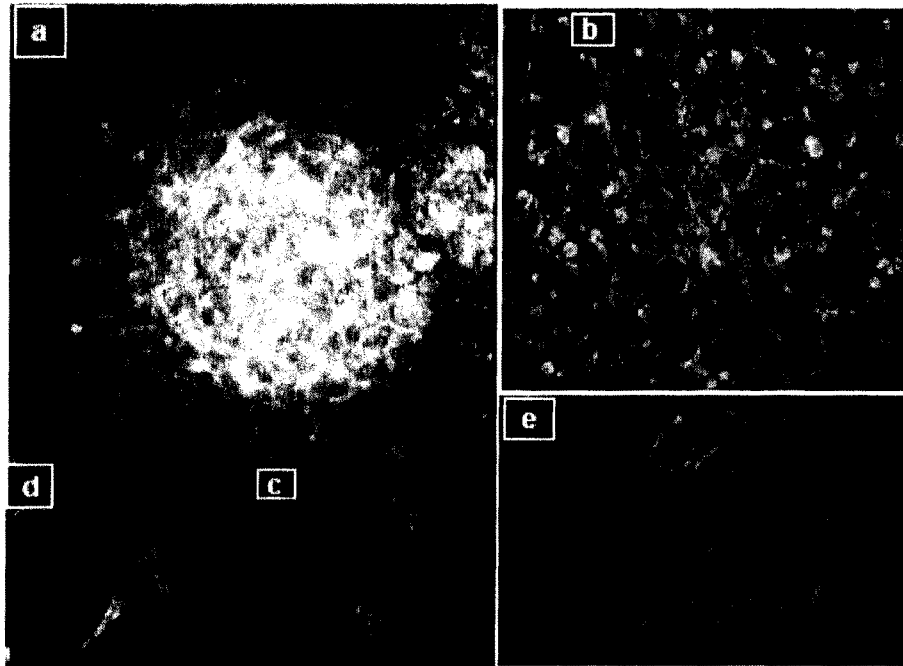


FIG. 3

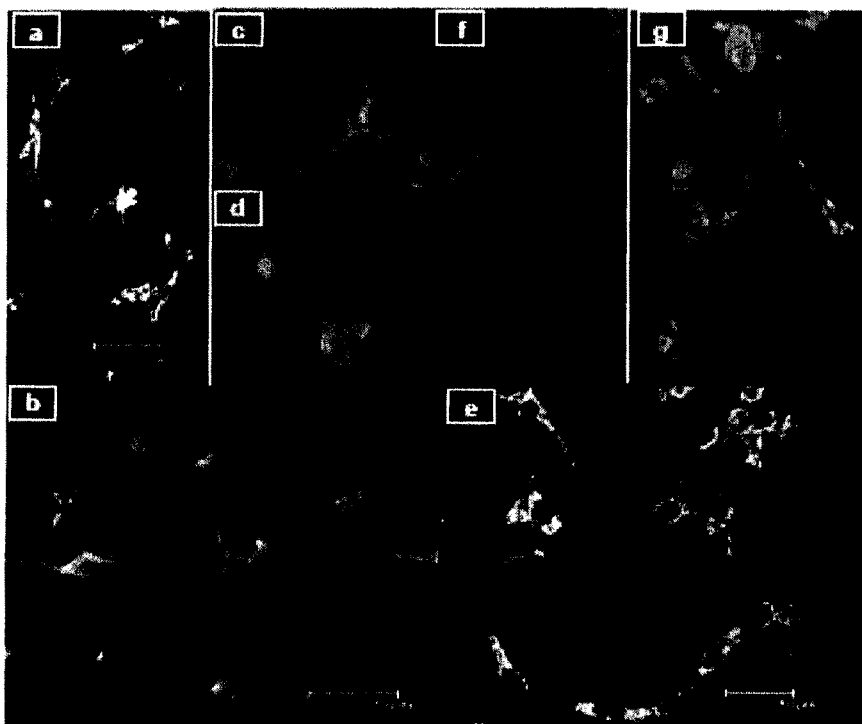


FIG. 4

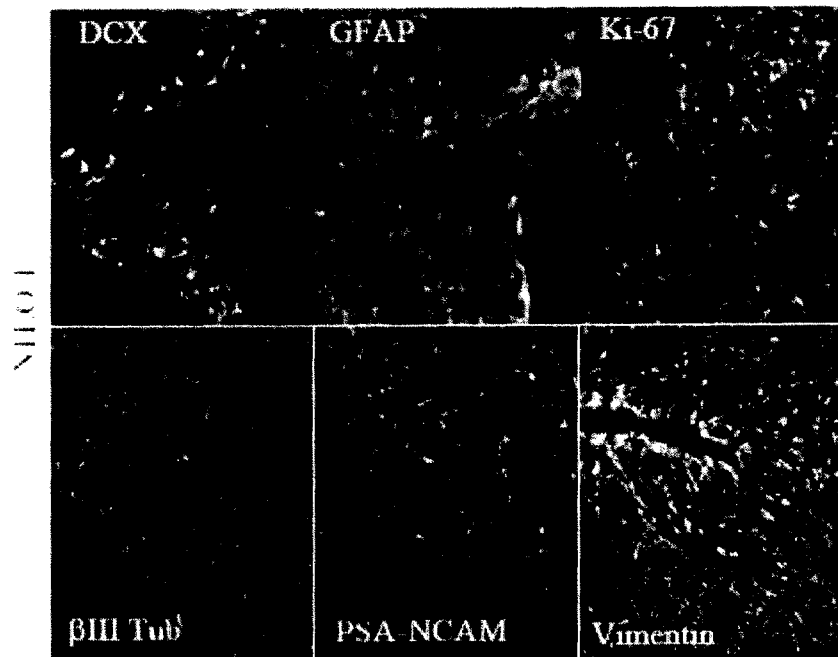


FIG. 5

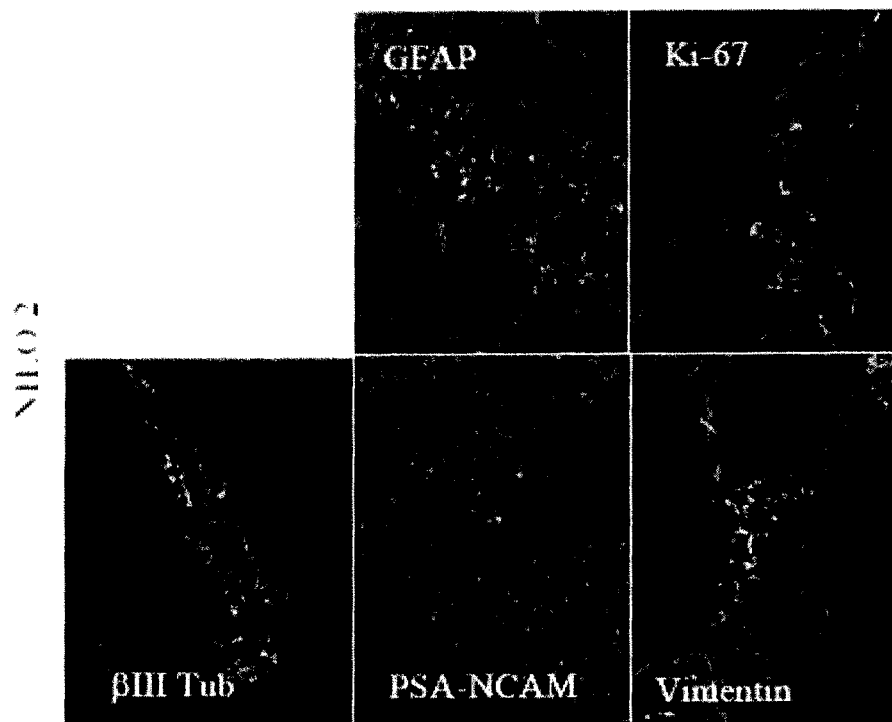
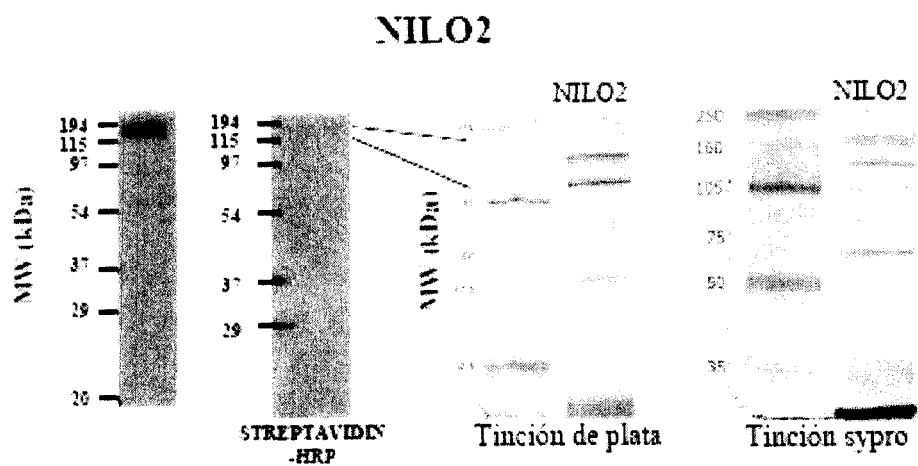
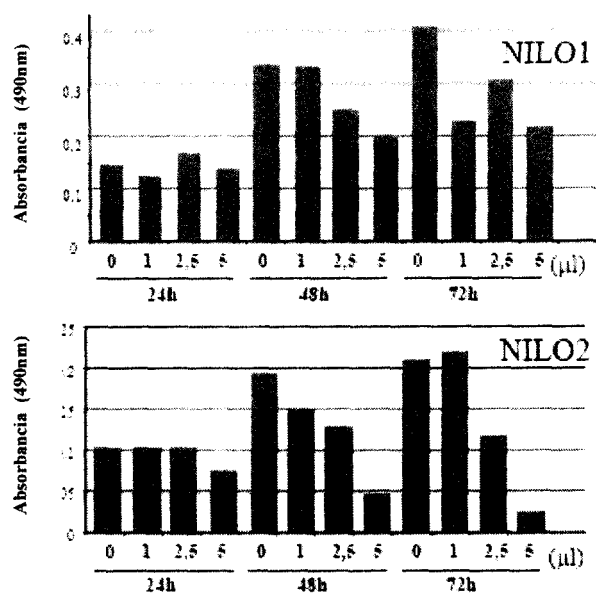


FIG. 6



**FIG. 7**

**Efecto de los anticuerpos NILO en la proliferación celular**



**FIG. 8**

# Efecto de los anticuerpos NILO en la diferenciación

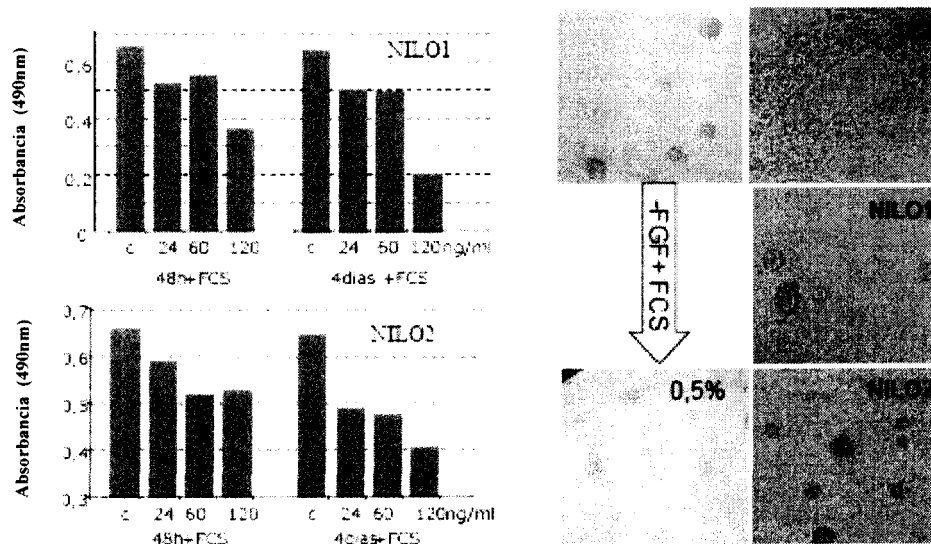


FIG. 9

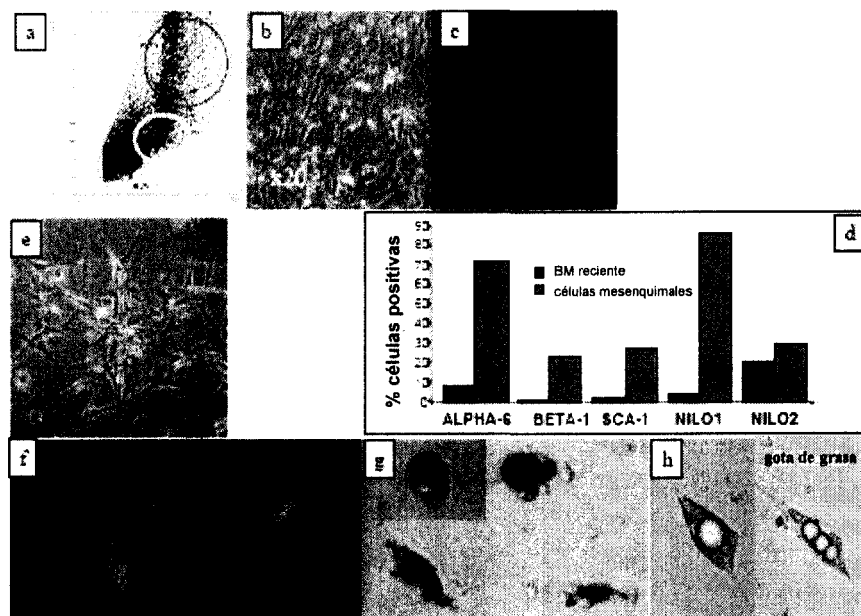


FIG. 10

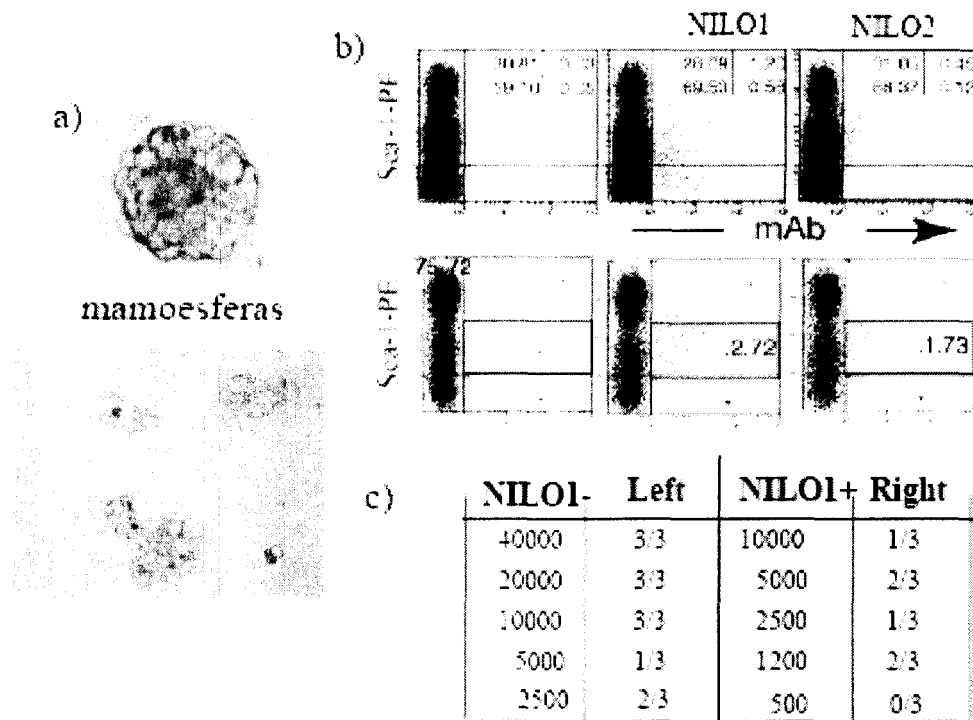


FIG. 11

# ES 2 354 661 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de membrana de células progenitoras neurales, anticuerpos producidos por dicho método, y usos

<130> ES1641.9

10 <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1  
<211> 319  
<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cadena pesada de Nilo1 (Heavy Chain secuencia parcial). Región traducida a partir del nucleótido 174

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)

30 <223> n is a, c, g, t or u

<220>  
<221> misc\_feature

35 <222> (9)..(9)  
<223> n is a, c, g, t or u

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> n is a, c, g, t or u

45 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)

50 <223> n is a, c, g, t or u

<220>  
<221> misc\_feature

55 <222> (230)..(230)  
<223> n is a, c, g, t or u

60 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (308)..(308)  
<223> n is a, c, g, t or u

65

# ES 2 354 661 A1

<400> 1

	<b>tggangggnc anagncccag ccttcctgt ccccatcgag aaaaccatct ccaagcgtag</b>	<b>60</b>
5	<b>agggcaactt caggttccac aggtgtacac catgccccca cccaaggagc agctgaccca</b>	<b>120</b>
	<b>gagccaggtc agtctcacct gcatgataaa aggccttctac cccgaggata ttgatgtggc</b>	<b>180</b>
10	<b>ctggcagaag aacggacagc cagagcagag cttcaagaac accccaccn ccttgacac</b>	<b>240</b>
	<b>ggatgagact tacttcctct acagcaagtt ggatgtgaag aaggaccatt gggagaaggg</b>	<b>300</b>
	<b>agattttntt acatgttct</b>	<b>319</b>

15

<210> 2

<211> 267

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

25

<223> Cadena ligera de Nilo1 (light chain secuencia parcial). Región traducida a partir del nucleótido 116)

<220>

<221> misc\_feature

30

<222> (6) .. (6)

<223> n is a, c, g, t or u

<220>

35

<221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> n is a, c, g, t or u

40

<400> 2

	<b>cagggngnaa agctccaaga ggtaggagg gaagactgag aatggccta gggagcaggt</b>	<b>60</b>
45	<b>ggtggtgcct caggacctct ggctctaaca ctcatctctg ttcagggctt tgacaatggc</b>	<b>120</b>
	<b>tgagttgat gtcttatgag taacctcaca ggtatacagg ttatgcctct cataatctgc</b>	<b>180</b>
	<b>tttggtcagc gagaggggtgc tgctcaggct gtaggtgatg tctttgctgt cctgatcagt</b>	<b>240</b>
50	<b>gacactctgc tttgatacca ctgctta</b>	<b>267</b>

<210> 3

55

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60

<220>

<223> Cadena pesada de Nilo2 (Heavy Chain secuencia parcial). Región traducida a partir del nucleótido 87.

<220>

65

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

## ES 2 354 661 A1

<223> n is a, c, g, or t  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 20 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 3  
 25 **cccnaagggg nacttncggt tcncaggtgt acaccatgcc cccaccaag gagcagctga 60**  
**cccagagcca ggtcagtctc acctgcatga taaaaggctt ctaccccgag gatattgatg 120**  
 30 **tggcctggca gaagaacgga cagccagagc agagcttcaa gaacaccca cccgtcttgg 180**  
**acacggatga gacttacttc ctctacagca agctc gatgt ga 222**  
 35 <210> 4  
 <211> 439  
 <212> DNA  
 40 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Cadena ligera de Nilo2 (light chain secuencia parcial). Región traducida a partir del nucleótido 171  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 50 <223> n is a, c, g, t or u  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (8)..(8)  
 <223> n is a, c, g, t or u  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> n is a, c, g, t or u  
 65 <220>  
 <221> misc\_feature



# ES 2 354 661 A1

<222> (42)..(42)

<223> n is a, c, g, t or u

5 <400> 4

	<b>gngaaggngn cttgggagaa gctccagacc ttaggagggga angactgaga atggtcctag</b>	<b>60</b>
10	<b>ggagcaggtg gtggtgcctc aggacctctg gctctacact cattcctgtt cagggctctg</b>	<b>120</b>
	<b>acaatggctg cagttgatgt cttatgagta acctcacagg tatacagggtt atgcctctca</b>	<b>180</b>
	<b>taatctgctt tggtcagcga gaggggtgctg ctcaggctgt aggtgctgtc tttgctgtcc</b>	<b>240</b>
15	<b>tgatcagtga cactctgcag gacgccatct cgtttttcac tgccatctac tttccacttg</b>	<b>300</b>
	<b>acattgatgt ctttggggta gaagttgttc acgaagcaca caagtgtggc gcttccagtg</b>	<b>360</b>
20	<b>cccaactgct cactggatgg tgggaagatg gagacggttg gcttagcatc agcccgtttg</b>	<b>420</b>
	<b>atttccagct tggtgccgg</b>	<b>439</b>

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200801324

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.05.2008

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2007114634 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 11.10.2007, ejemplos 1,2,3.	1
A		2-14
Y	VERGAÑO-VERA, E., YUSTA-BOYO, M. J., DE CASTRO, F. et al. Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. Development. Noviembre 2006, Vol. 133, Nº 21, páginas 4367-4379. ISSN 0950-1991.	1
A		2-5
A	JP 2007055965 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN SANGYO GIJUTSU SO) 08.03.2007, (resumen) Base de datos WPI Thomson Scientific, Londres [en línea] [recuperado el 15.07.2009] Recuperado de: EPOQUE. DW200741, Nº acceso 2007-424090 [41].	1-14
A	WO 2004020597 A2 (STEM-CELLS, INC.) 11.03.2004, ejemplos 2,4,6.	2-14
A	CICCOLINI, F., MANDL, C., HÖLZL-WENIG, G. et al. Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. Developmental Biology. Agosto 2005, Vol. 284, Nº 1, páginas 112-125. ISSN 0012-1606. <Doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.007>	2-14
A	ISLAM, M. O., KANEMURA, Y., TAJRIA, J. et al. Characterization of ABC transporter ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. FEBS Letters. Julio 2005, Vol. 579, Nº 17, páginas 3473-3480. ISSN 0014-5793. <Doi:10.1016/j.febslet.2005.05.019>	2-14
A	BÜHRING, H.-J., KUÇI, S., CONZE, T. et al. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. Stem Cells. Enero 2004, Vol. 22, Nº 3, páginas: 334-343. ISSN 1066-5099. <Doi:10.1634/stemcells.22-3-334>	2-14
A	VICARIO-ABEJÓN, C., YUSTA-BOYO, M. J., FERNÁNDEZ-MORENO, C., DE PABLO, F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. The Journal of Neuroscience. Febrero 2003, Vol. 23, Nº 3, páginas 895-906. ISSN 0270-6474.	1-5

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.02.2011

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/7



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200801324

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.05.2008

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RITTER, M. A., LADYMAN, H. M. Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application. Primera Edición. Nueva York: Cambridge University Press. 1995. Capítulo 2: Production of Monoclonal Antibodies, apartado 2.2.5 (páginas 13, 14).	1

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.02.2011

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
2/7

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K16/28** (01.01.2006)  
*G01N33/569* (01.01.2006)  
*G01N33/577* (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, MEDLINE, BIOSIS, EMBL, NPL, COMPENDX, INSPEC, TXTe, EMBLall

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2011

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-18  
Reivindicaciones

**SI**  
**NO**

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 2-18  
Reivindicaciones 1

**SI**  
**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007114634 A1	11.10.2007
D02	VERGAÑO-VERA, E. et al. Development. Noviembre 2006, Vol. 133, Nº 21, páginas 4367-4379.	11.2006
D03	JP 2007055965 A	08.03.2007
D04	WO 2004/020597 A2	11.03.2004
D05	CICCOLINI, F. et al. Developmental Biology. Agosto 2005, Vol. 284, Nº 1, páginas 112-125.	08.2005
D06	ISLAM, M. O. et al. FEBS Letters. Julio 2005, Vol. 579, Nº 17, páginas 3473-3480.	07.2005
D07	BÜHRING, H.-J. et al. Stem Cells. Enero 2004, Vol. 22, Nº 3, páginas: 334-343.	01.2004
D08	VICARIO-ABEJÓN, C. et al. The Journal of Neuroscience. Febrero 2003, Vol. 23, Nº 3, páginas 895-906.	02.2003
D09	RITTER, M. A. et al. Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application. Primera Edición. Nueva York: Cambridge University Press.	1995

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, es el desarrollo de un método para generar anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos de membrana de células progenitoras neurales, que comprende la inmunización de hámsteres armenios, con neuroesferas obtenidas a partir del cultivo de células del bulbo olfatorio de un embrión de ratón de 13,5 días (reivindicación 1). Además, se incluyen en la solicitud, dos anticuerpos obtenidos mediante dicho método y específicos de células progenitoras neurales: uno, llamado NILO1, producido por el hibridoma de número de acceso DSM No. ACC2887, y cuya cadena pesada comprende la SEQ. ID. NO. 1, y la cadena ligera la SEQ. ID. NO. 2; y otro, denominado NILO2, producido por el hibridoma DSM No. ACC2881, y cuya cadena pesada comprende la SEQ. ID. NO. 3, y la cadena ligera la SEQ. ID. NO. 4 (reivindicaciones 2 y 3). NILO2 es específico de proteínas de superficie de 140 y 170 kD. NILO1 interacciona, además de con células progenitoras neurales, con células precursoras mesenquimales de médula ósea y de tejido mamario. Tanto NILO1 como NILO 2, inhiben la proliferación y diferenciación de las neuroesferas. Así mismo, se contemplan las construcciones génicas que transcriben estos anticuerpos, y los hibridomas de número de acceso DSM No. ACC2887 y DSM No. ACC2881 (reivindicaciones 4 y 5 respectivamente). También son objeto de la invención, un método de obtención de una población enriquecida en células progenitoras neurales, que comprende poner en contacto una población celular con estos anticuerpos (reivindicaciones de la 6 a la 11); así como la población celular enriquecida mediante este método (reivindicación 12); y el uso de dicha población en la elaboración de un medicamento (reivindicaciones 13 y 14). Por último, se incluye un procedimiento de selección de fármacos, que comprende la inyección de la población celular enriquecida, en un mamífero no humano (reivindicaciones de la 15 a la 18).

D01 anticipa un procedimiento de producción de anticuerpos frente células progenitoras neurales humanas, que comprende la inmunización de ratones Balb/c con células progenitoras neurales humanas obtenidas a partir de una línea de células madre embrionarias.

En D02 se divulga la presencia de células precursoras neuronales en el bulbo olfatorio de embriones de ratón de 13,5 días. Estas células precursoras se pueden diferenciar en distintos tipos de neuronas e interneuronas.

D03 describe un método de obtención de anticuerpos monoclonales útiles en la identificación de células madre o precursoras neuronales. En este caso, se inmunizan ratones Balb/c hembra con células madre o precursoras neuronales humanas. Los linfocitos se fusionan con la línea celular F0-1 de mieloma.

En D04 se anticipa un procedimiento de aislamiento y enriquecimiento de células madre o progenitoras neurales, mediante la selección de neuroesferas CD49<sup>+</sup>/CD24<sup>-lo</sup>. CD49f es una proteína de superficie de 140 kD que se expresa en neuroesferas.

D05 desarrolla un procedimiento de aislamiento de células madre neurales, mediante la separación de las células neurales que expresan EGFR. Este receptor tiene un peso molecular de 170 kD.

En D06 se investiga el posible uso del transportador ABCB1, de 170 kD, como marcador de células madre o progenitoras neurales. De hecho, se podrían utilizar los anticuerpos específicos frente a esta proteína, para aislar células madre o progenitoras neurales procedentes de neuroesferas, mediante citometría de flujo. ABCB1 también se expresa en células madre mesenquimales, hematopoyéticas y pancreáticas.

D07 muestra que la proteína transmembrana CDCEP1 es un marcador de células progenitoras hematopoyéticas, células madre o progenitoras mesenquimales y células progenitoras neurales, a demás de diferentes células tumorales. Sin embargo, no es posible comprobar si los tipos celulares donde se expresa, son los mismos frente a los que es específico NILO1.

Cabe resaltar, que en ninguno de los documentos de D04 a D07, se afirma que la unión de un anticuerpo a los distintos marcadores descritos, produzca una parada en la proliferación o diferenciación de las neuroesferas.

En D08 se divulga la presencia de células madre neurales en el bulbo olfatorio de embriones de ratones de 13,5 días.

D09 anticipa el uso de hámsteres armenios como animales generadores de anticuerpos, cuando el antígeno utilizado es de ratón.

#### 1.NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

Las reivindicaciones de la 1 a la 18 cumplen el requisito de novedad.

#### 2.ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

##### 2.1. REIVINDICACIÓN 1

El objeto de la presente solicitud, de acuerdo con la reivindicación 1, es un método para generar anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de membrana de células progenitoras neurales, que comprende las siguientes etapas:

- a) Generación de neuroesferas a partir del bulbo olfatorio de embriones de ratón de 13,5 días
- b) Inmunización de hámsteres armenios con las neuroesferas de la etapa a)
- c) Obtención de los linfocitos del animal inmunizado y su fusión con células de mieloma de Balb/c, generando así hibridomas.
- d) Determinación y/o selección de los anticuerpos generados por los hibridomas mediante citometría de flujo de neuroesferas tratadas con yoduro de propidio.

D01 se considera el documento más cercano. En él se obtiene un anticuerpo monoclonal específico de células progenitoras neurales, mediante la inmunización de ratones Balb/c con células progenitoras humanas provenientes de la línea de células madre embrionarias humanas Miz-hES1. Los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma NS1 y se seleccionaron los anticuerpos mediante citometría de flujo de células progenitoras neurales tratadas con yoduro de propidio.

La principal diferencia entre la presente solicitud y D01 reside en las etapas a) y b) del procedimiento, es decir, la utilización de neuroesferas procedentes de células del bulbo olfatorio de embriones de ratón de 13,5 días como antígeno, en vez del uso de células progenitoras neurales humanas procedentes de células madre embrionarias humanas.

El efecto técnico es la selección de anticuerpos que tengan especificidad frente a otros antígenos de la superficie de membrana de las células progenitoras.

El problema a resolver es por tanto, el desarrollo de un método alternativo de obtención de anticuerpos frente a otros antígenos de membrana de las células progenitoras neurales.

D02 divulga la presencia de células progenitoras neurales en el bulbo olfatorio de embriones de ratón de 13,5 días, siendo común su cultivo en forma de neuroesferas.

En consecuencia, un experto en la materia, probaría el uso de neuroesferas procedentes de células del bulbo olfatorio de embriones de ratón de 13,5 días (D02), como antígeno para conseguir anticuerpos monoclonales frente células progenitoras neurales (D01), con una expectativa razonable de éxito.

Ya es conocido en el estado de la técnica, que es aconsejable el uso de hámsteres armenios como animales generadores de anticuerpos cuando el antígeno es de naturaleza murina, por lo que esta diferencia no se considera relevante, sino consecuencia de la naturaleza del antígeno.

Por otro lado, la elección de una línea de mieloma u otra para la formación del hibridoma, es una de las meras alternativas disponibles para el experto en la materia.

Dados los argumentos anteriores, se considera que la reivindicación 1 no presenta actividad inventiva.

## 2.2. REIVINDICACIONES DE LA 2 A LA 18

Las reivindicaciones de la 2 a la 18 tienen actividad inventiva.